

Protocolos para la recogida de muestras en restos bioantropológicos. El caso del Tolmo de Minateda.

**Alejandra Calderón Ordóñez,
Aioze Trujillo Mederos,
Guacimara Ramos Pérez,
Nuria Álvarez Rodríguez**
Universidad de la Laguna (Tenerife)
alejacalderono@gmail.com
aioze_mederos@hotmail.com
gmara.ramos@gmail.com
nuriaalvarezrodriguez@gmail.com

RESUMEN

Uno de los logros reconocidos de la antropología como disciplina científica es haber conseguido unificar los criterios y protocolos de estudio del material antropológico, sobre todo en aspectos de carácter básico y general (Ferembach et al., 1979; Buikstra y Ubelaker, 1994; Campillo, 2001, entre otros). Teniendo en cuenta la importancia que han cobrado en los últimos años los análisis de laboratorio, químicos, genéticos, de isótopos, etc. en el estudio de los restos bioantropológicos, consideramos de gran importancia la estandarización en la recogida de las muestras que serán sometidas a estos procedimientos, como un paso indispensable en la validación de los resultados de éstos.

Por esta razón hemos planteado la compilación y redacción de unos protocolos básicos que permitan la sistematización de una adecuada recogida de las muestras, facilitando así a los arqueólogos la valoración y el estudio de los materiales bioantropológicos. Estos protocolos tienen como finalidad la creación de un banco de muestras de distintos yacimientos, ya que si bien no siempre los proyectos cuentan con los medios necesarios para realizar todo tipo de análisis, la recogida adecuada de las muestras no implica ninguna dificultad y por el contrario brinda la posibilidad de poder realizar una gran cantidad de análisis en un futuro, permitiendo ampliar la información que se puede obtener del estudio de restos humanos.

En este trabajo utilizaremos, a modo de ejemplo, el protocolo seguido en la recogida de muestras del material proveniente del Tolmo de Minateda, Albacete, depositado para su estudio en el Laboratorio de Prehistoria de la Universidad de La Laguna. Aunque en este caso la toma de muestras se realizó exclusivamente en el laboratorio, el ideal sería que el proceso se iniciara directamente en el campo, para disminuir los riesgos de una posible contaminación. En definitiva, nuestra propuesta pretende ser una herramienta más para los arqueólogos en su camino hacia la reconstrucción de los procesos sociales y su impacto sobre los seres humanos, tanto en un plano biológico como cultural.

Palabras clave:

Antropología, protocolo, muestreo.

ABSTRACT

One of the most important achievements of anthropology as a scientific discipline has been its ability to unify criteria and protocols to study anthropological remains, specially in the most basic and general aspects (Ferembach et al., 1979; Buikstra y Ubelaker, 1994; Campillo, 2001 among others). Taking into account the increasing importance of laboratory analysis, such as chemical, genetical, isotopic etc., in the

Rebut: 1 septembre 2010; Acceptat: 1 decembre 2010

study of anthropological remains, we consider necessary to go for an standardization in the collection of the samples that are going to be used for this kind of procedures. This is necessary as a previous step of validation for further results.

Therefore we propose a set of basic protocols that allow the researchers a systematization and an adequate sample collection. This will help the archaeologists in their study of anthropological materials. The purpose of these protocols is the creation of a sample's bank from different archaeological sites. Even though not all research teams have the means to make all kinds of analysis, the right collection of the sample implies no difficulty and it could allow these analysis to be made in the future, increasing the information obtained from the study of human remains.

In this paper we will use, as an example, the protocol followed in the sample collection from the material from "El Tolmo de Minateda", Albacete, that was studied in the Prehistorian Lab of the Universidad de La Laguna. Although in this case the sample collection was made exclusively inside the lab, the ideal scenario would be for the process to be started in the field, to diminish the risk of contamination. Our proposal pretends to be another tool for archaeologists in their way towards the reconstruction of the social process and its impact in human beings, in both biological and cultural aspects.

Keywords:

Antropology, protocol, sampling.

RESUM

Un dels èxits assolits per l'antropologia com disciplina científica és haver aconseguit unificar els criteris i protocols d'estudi del material antropològic, sobretot en aspectes de caràcter bàsic i general (Ferembach et al., 1979; Buikstra y Ubelaker, 1994; Campillo, 2001, entre otros). Tenint en compte la importància que han pres els últims anys els anàlisis de laboratori, químics, genètics, d'isòtops, etc., en l'estudi de les restes bioantropològiques, considerem de gran importància l'estandardització en la recollida de les mostres que seran sotmeses a aquests procediments, com un pas indispensable en la validació dels resultats d'aquests.

Per aquesta raó hem plantejat la compilació i redacció d'uns protocols bàsics que permetin la sistematització d'una adequada recollida de les mostres, facilitant així als arqueòlegs la valoració i l'estudi dels materials bioantropològics. Aquests protocols tenen com a finalitat la creació d'un banc de mostres de diferents jaciments, ja que si bé els projectes no sempre compten amb els mitjans necessaris per realitzar tot tipus d'anàlisi, la recollida de les mostres no implica cap dificultat i, pel contrari, brinda la possibilitat de poder realitzar una gran quantitat d'anàlisi en un futur, permetent ampliar la informació que es pot obtenir de l'estudi de restes humanes.

En aquest treball utilitzarem, a mode d'exemple, el protocol seguit en la recollida de mostres del material provinent del Tolmo de la Minateda, Albacete, dipositat per al seu estudi al Laboratorio de Prehistoria de la Universidad de La Laguna. Encara que en aquest cas la presa de mostres es va realitzar exclusivament al laboratori, l'ideal seria que el procés s'iniciaria directament al camp, per disminuir els riscos d'una possible contaminació. En definitiva, la nostra proposta preté ser una eina més per a arqueòlegs en el seu camí vers la reconstrucció dels processos socials i el seu impacte sobre els éssers humans, tant en un pla biològic com cultural.

Paraules Clau:

Antropologia, protocol, mostreig.

INTRODUCCIÓN

Dentro de cualquier disciplina científica, la estandarización de procedimientos es una herramienta fundamental. La arqueología y la bioantropología no son ajenas a esta tendencia; ya desde sus comienzos se han buscado protocolos y criterios de análisis comunes para ser aplicados a las distintas colecciones. Entre estos esfuerzos destacan aquellos que se han convertido en referente a la hora de estudiar cualquier conjunto de restos bioantropológicos (Ferembach et al., 1979, Buikstra, 1994, Campillo, 2001). Estos protocolos hacen referencia sobre todo a los estudios macroscópicos de los restos y a la información que se puede obtener de ellos, siendo la base de la bioantropología más tradicional, vigente aún en multitud de casos.

Sin embargo, con el desarrollo tecnológico del que hemos sido testigos en los últimos años y, sobre todo, con la concienciación por parte de los investigadores de la necesidad de una multidisciplinariedad en los diversos estudios, estos protocolos pueden quedarse cortos. El acceso a nuevos tipos de análisis, en este caso sobre todo a analíticas químicas y biológicas, plantea nuevos retos al arqueólogo, ya que de la correcta toma de las muestras dependerán en gran medida las posibilidades de obtener resultados. Incluso se puede decir que una recolección errónea puede invalidar los datos obtenidos a partir de ésta.

Como consecuencia de lo anterior esta ponencia se propone facilitar el trabajo del arqueólogo en el momento en que se proceda a la toma de muestras. Éstas se han dividido en dos grupos fundamentales. Por un lado aquellas que tienen como finalidad diversas analíticas químicas (oligoelementos e isótopos estables) y, en segundo lugar, las destinadas a estudios de biología molecular.

Uno de los grandes problemas en este tipo de

análisis es el riesgo de encontrar agentes contaminantes de diversa índole. Por ello, la situación ideal sería que el arqueólogo recogiera las muestras directamente en el campo, minimizando así la exposición de las muestras a la contaminación y valorando directamente la fuente de posible contaminación en el contexto arqueológico. Sin embargo, esto no siempre es posible y las muestras son seleccionadas en el laboratorio, como en el ejemplo que aquí se presenta. Los restos humanos provenientes del yacimiento medieval del Tolmo de Minateda (Albacete), han sido analizados en el laboratorio de bioantropología de la Universidad de La Laguna, y de ellos se han extraído distintas muestras de cara a la realización de análisis como los ya mencionados.

A partir de este ejemplo se proponen una serie de protocolos, que hacen referencia a la cantidad de muestra necesaria para cada tipo de analítica, así como a las regiones anatómicas más adecuadas para la toma para cada una de ellas y las problemáticas particulares en cada tipo de análisis.

Esta ponencia también pretende llamar la atención sobre la importancia de la creación de bancos de muestras con la mayor cantidad de yacimientos posibles. Siendo conscientes de que no todas las excavaciones cuentan con los medios, o las facilidades, para realizar todos los análisis, defendemos que ello no debe condicionar la recolección de las muestras. Puede suceder que en otro momento se tenga acceso a los diferentes análisis o que se pueda realizar un intercambio de muestras con otras instituciones, permitiendo así obtener la mayor cantidad de información sobre los yacimientos excavados.

Partiendo de que la finalidad de las investigaciones arqueológicas es la reconstrucción de los modos de vida de las poblaciones del pasado, el deber del arqueólogo es intentar utilizar todos

los medios a su disposición para alcanzar este propósito. Por ello, es importante resaltar la necesidad de unos protocolos que faciliten el intercambio de muestras y de resultados; lo que enriquecerá los estudios arqueológicos, y especialmente los bioantropológicos.

Estudios Químicos

Los Oligoelementos

Los oligoelementos son sustancias químicas que se encuentran en pequeñas cantidades en el organismo para intervenir en su metabolismo. Se les conoce de esta manera (oligoelementos) debido a que la cantidad presente es tan pequeña que no son detectables por los métodos clásicos de análisis. Los elementos que cumplen funciones muy concretas e imprescindibles para la vida, en su mayoría metales, son los denominados esenciales, y su total privación puede generar enfermedad o muerte. Otros en cambio, son relativamente inertes y se incorporan al organismo al ser absorbidos como parte de la dieta, o bien a través de las mucosas o la piel. Aquellos elementos que no son esenciales para el organismo se eliminan rápidamente del organismo o pueden depositarse en los tejidos. Si el tejido no se renueva rápidamente, la cuantía de ese elemento encontrado en ese tejido puede reflejar de forma aproximada la cantidad ingerida. En cambio, si el elemento es esencial para el organismo, y es metabólicamente activo, es decir, necesario para el mantenimiento de las funciones metabólicas, la cuantía presente en un determinado tejido dependerá de la cuantía y continuidad del aporte utilizado (Arnay de la Rosa, 2008).

En un inicio este tipo de estudios aportaba información sobre la proporción de elementos vegetales o cárnicos que habían sido ingeridos (Brown, 1974, Price, 1982). Muy pronto se consideró que conocer la alimentación de un grupo humano podía facilitar también conocer otros comportamientos sociales. Ya en 1985

Ericson planteaba que era factible detectar la presencia de soldados muertos en batallas en tierras extranjeras y, por tanto, también posibles migraciones, al considerar que la alimentación del grupo llegado a dichas tierras era distinta al grupo preestablecido en la zona (Ericson, 1985)¹. Pero una de las grandes líneas de investigación desarrolladas a partir de los análisis químicos ha sido para conocer la existencia de posibles diferencias sociales en el acceso a los distintos recursos alimenticios, incluyendo también las existentes entre los distintos grupos de edad y sexo.

La proporción de estos elementos en los alimentos es diferente, especialmente en ciertos elementos, como el estroncio, el bario, el zinc o el manganeso. De esta manera, el bario y el estroncio se encuentran en mayor cantidad en los productos vegetales, mientras que el zinc o el manganeso están presentes en las proteínas musculares, por lo tanto, de origen animal². Este hecho supone que a la hora de obtener resultados químicos de restos óseos, podemos inferir, dependiendo de la cantidad de elementos que se encuentren presentes, el tipo de alimentación que llevarían en vida esos individuos. Aún así, es necesario tener en cuenta que algunos elementos como el zinc, metabólicamente muy activo, es utilizado de forma continua por el organismo, especialmente en procesos de reparación celular, por lo que la interpretación del contenido en el tejido puede resultar problemática (Arnay de la Rosa, 2008). Por ello, actualmente se reconocen las limitaciones de estos análisis en la mayoría de los elementos, quedando limitada su utilidad para la determinación de las paleodietas al estroncio y el bario. Además, debemos tener en cuenta que los elementos a analizar deben depositarse en el hueso y en el diente, porque son estas estructuras las que perduran en los individuos prehistóricos, limitando aún más los elementos aptos para la reconstrucción de la dieta.

De esta manera, algunos de los elementos que pueden proporcionar información útil al investigador son el estroncio y el bario, los cuáles aportan información acerca del tipo de dieta consumida, de tipo vegetal o animal; y el plomo y el cadmio, absorbidos por vía digestiva, por la piel o las mucosas, expresando en este caso el grado de contaminación ambiental al que estaba sometido el individuo.

Estroncio y bario

El estroncio (Sr) es un elemento que es absorbido del suelo por los vegetales en proporciones fijas. El mecanismo por el cuál podemos conocer si estamos ante una dieta más vegetariana que carnívora tiene que ver con las diferentes concentraciones tisulares de ese elemento en el hueso de los individuos. Los vegetales que absorben el estroncio, no discriminan entre éste y el calcio, pero el animal que consume vegetales sí discrimina entre estroncio y calcio en su intestino, por lo que las cantidades de estroncio se encontrarán en proporciones inferiores a las de los vegetales, a pesar de llevar una dieta puramente vegetariana. Cuando un herbívoro es devorado por un carnívoro ocurre el mismo proceso de discriminación, por lo que ahora las concentraciones de estroncio en los tejidos del carnívoro serán muy inferiores a las del herbívoro, mostrando así un patrón claro de diferenciación entre dieta vegetariana y carnívora³.

Además de la información ofrecida por el estroncio, también se ha visto que este elemento en alimentos procedentes del medio marino es elevado, lo que permite diferenciar también, a través del estroncio, entre un consumo de alimentos de origen terrestre de los derivados del origen marino. Pero es muy difícil poder diferenciar una u otra dieta a través del estroncio solamente, porque unas concentraciones elevadas de este elemento podían ser, tanto de productos vegetales como marinos. Este problema ha sido resuelto a través del bario (Ba)(González-Reimers, 2008).

El bario es un elemento similar al calcio y al estroncio, discriminado también en el intestino animal superior, pero por la escasa solubilidad de sus sales, es prácticamente inexistente en el medio marino, donde sí abunda el estroncio. Por eso, calculando el índice bario/estroncio (Ba/Sr) es posible distinguir entre un tipo de dieta marina o vegetal⁴. El problema que presenta el análisis de estos elementos es que hay que tener presentes las modificaciones que pudieron haberse producidos en el hueso después de los enterramientos, las alteraciones diagenéticas entre suelo circundante y hueso o viceversa. Así los análisis deben valorar de forma adecuada que las muestras no tienen elementos contaminantes o haber sufrido procesos diagenéticos que alteren el resultado paleodietético.

El calcio

Este elemento supone el componente químico esencial en el hueso, siendo el esqueleto el depositario del 99% del calcio presente en el organismo (Velasco Vázquez, 1999). El calcio no ofrece información por sí mismo de la dieta consumida por los individuos analizados, pero sí debe tenerse en cuenta. La razón es que el calcio será sustituido por otros elementos de forma desigual en función de los alimentos consumidos. En cualquier estudio para poder determinar la dieta real de las poblaciones antiguas es necesario hacer una estimación de los procesos de absorción del calcio. Los resultados condicionarán las proporciones en las que puedan encontrarse el resto de los oligoelementos. El objetivo de la determinación del calcio es controlar en la medida de lo posible el proceso diagenético. En efecto, si recordamos la composición del hueso, un 27% aproximadamente de su peso seco está constituido por Ca por lo que la concentración (en ppm) de dicho elemento debería oscilar alrededor de 270.000; el esmalte dado que es un tejido con mucho menor cantidad de materia orgánica puede tener una mayor proporción de Ca.

La toma de muestras para el estudio químico debe comenzar en el yacimiento. Esto es muy importante, ya que desde el mismo momento que comienzan los trabajos de excavación, debemos tomar, tanto muestras de sedimento de distintas zonas en contacto con el hueso, como anotar todo aquello que podamos considerar que altera nuestra muestra. La toma de muestras del sedimento es un paso imprescindible, ya que un análisis del mismo podrá determinar los posibles problemas diagenéticos.

Una vez que tenemos las muestras del sedimento, pasamos a la extracción de las muestras en hueso para someterlas posteriormente a los distintos análisis. Antes de comenzar con este paso, debemos tener en cuenta que vamos a utilizar un método destructivo, por lo que será necesario un análisis previo de la muestra en sí. Es en este momento cuando debemos tomar las fotos que creamos oportunas, el análisis macroscópico, la medición de los huesos y dientes, la extracción del sarro, etc., porque una vez seleccionada la muestra y enviada a los distintos laboratorios la pérdida del material es irreversible.

Cuando haya finalizado este estudio previo a la toma de muestra, la selección de las mismas debe comenzar por tomar siempre las partes de hueso poco significativo, que no puedan ofrecernos información relevante. En este caso debemos desechar los huesos que pueden ser importantes para valorar problemas epigenéticos, las inserciones musculares, el desgaste en el caso de los dientes, las hipoplasias o dientes cariosos. Una vez hemos descartado las posibles muestras significativas en el estudio antropológico, pasamos a la elección de las muestras susceptibles de ser analizadas para el estudio de los oligoelementos.

De esta manera el protocolo a seguir es el siguiente:

Dientes:

Los dientes que deben seleccionarse para someterlos a análisis químicos deben ser dientes fragmentados, ya que éstos se destruirán en el proceso químico, por lo que es necesario conservar el mayor número posible de dientes en buen estado.

Los dientes deben conservar esmalte suficiente, unos 200mg aproximadamente. Esta cifra es importante, sobre todo en el caso de análisis químico en los que se analizan por separado el esmalte y la dentina, en donde se buscan patrones alimenticios que incluyan la etapa de crecimiento y la vida adulta del mismo individuo.

El diente o fragmento de diente debe pesar entre 1 y 5 gr. Es conveniente que en alguna de las muestras seleccionemos junto con el diente, parte de hueso cortical mandibular. La inclusión de parte de hueso mandibular en nuestra recogida de muestras es importante también a la hora de poder valorar problemas de contaminación, ya que la dentina y el hueso deben presentar valores similares. Si no es así, podemos considerar que la muestra presenta problemas para poder interpretar los resultados químicos.

Hueso: debemos seleccionar dos tipos de muestra en el hueso:

Parte cortical: se debe escoger, fundamentalmente, parte de la tibia, de la cresta iliaca y el fémur. Cada una de las muestras de hueso cortical debe pesar entre 1 y 5 gr.

Parte esponjosa: se debe seleccionar de la tibia, la pala iliaca y el calcáneo. Cada muestra debe pesar también entre 1 y 5 gr.

Las cantidades propuestas para cada una de las muestras son suficientes como para que se conserve un excedente de las mismas, ya que es necesario contar con muestras de más, por si en

algún momento falla el análisis al que se la ha sometido.

Una vez que ya tenemos las muestras seleccionadas, debemos comprobar que la limpieza a la que el material fue sometido una vez en el laboratorio, es suficiente. Si vemos que las muestras continúan sucias, debemos volver a limpiarlas mecánicamente, con un pincel suave. Si la utilización del pincel o unas pinzas de madera no son suficientes, debemos pasar a la técnica de limpieza basada en el ultrasonido, con un tiempo estimado de 5 minutos. Este procedimiento se repetirá hasta que veamos que la muestra queda absolutamente limpia, siempre en turnos de 5 en 5 minutos. Cada tanda se anotará para ir controlando la muestra.

Finalmente, algunas de las muestras deben someterse al análisis del Microscopio de Barrido Electrónico (SEM). Se trata de un proceso muy conveniente en donde podremos observar las trabéculas del hueso y determinar si la muestra es válida para el análisis químico. En este caso se llevarán al SEM las muestras que se encuentren en peor estado, las que tengan raíces, suciedad, o cualquier otro tipo de contaminación que pueda afectar los resultados de los análisis. En el caso de los dientes no es necesario someterlos al Microscopio de Barrido Electrónico, ya que la dentina y el esmalte son materiales muy duros y no presentan problemas de contaminación.

Isótopos estables

Los estudios de isótopos estables se utilizan principalmente en estudios paleonutricionales. El objetivo es hacer una reconstrucción de la cadena trófica. Por lo tanto, es necesario tomar muestras tanto de los restos antropológicos, así como de los elementos vegetales y animales que pudieran haber configurado la alimentación de las poblaciones estudiadas.

Para este tipo de estudios se utilizan los isóto-

pos del Carbono y del Nitrógeno. Los isótopos estables son aquellos que no están sujetos a procesos de semidesintegración, sino que mantienen constantes sus proporciones a lo largo del tiempo. El interés que tiene el estudio de estos isótopos estables en los análisis de paleodieta estriba en que su metabolismo difiere ligeramente según su peso atómico. Por lo general, los isótopos más pesados suelen reaccionar más lentamente, y los ligeros a eliminarse con mayor facilidad. Eso explica que la concentración relativa de los mismos varía en los seres vivos en relación con la dieta consumida. Su variación está condicionada por dos factores. En primer lugar por el tipo de planta, ya que algunas plantas utilizan más o menos el isótopo pesado C13 o el ligero C12, que se transmite a aquellos que las consuman, tanto los animales como los humanos. Por eso el estudio de la concentración de C13 y C12 indica el tipo de plantas que podían haber formado parte de la dieta. En segundo lugar, permite diferenciar entre la dieta marina y la terrestre, porque ambos medios presentan unas concentraciones diferentes de los distintos isótopos, siendo, por ejemplo, mayor la concentración de N15 así como de C13 en la dieta marina. También se pueden distinguir entre las plantas denominadas C3, que fijan el carbono en una molécula de 3C, como los arbustos y herbáceas de climas templados, los cereales como el trigo, la cebada y el centeno; y las plantas C4 que incluirían a las gramíneas tropicales, las herbáceas tropicales como el mijo, el sorgo, el maíz, la soja o la caña.

El estudio de los isótopos estables utiliza el colágeno del hueso para realizar las mediciones. Por eso primero es necesario extraer el colágeno de las muestras de hueso, para lo que Ambrose (1989) estableció un metodología. Las muestras de huesos limpias se triturarían hasta obtener una granulometría general de menos de 0,7 mm. Luego se tomarían entre 200 y 250 mg de polvo de hueso que se disolverían con HCl,

para disgregar la fase de carbonato, mezclándose con ultrasonido. Luego de varias fases de enjuagado, se obtendría un residuo que es el que contiene el colágeno; a éste se le añadiría NaOH para eliminar contaminantes orgánicos como podrían ser los ácidos húmicos y lípidos. A continuación se le volvería a añadir HCl para gelatinizar el colágeno, siendo este proceso más eficiente si se mantiene el pH en 2, y se congelaría el sobrenadante, que sería donde está el colágeno. La cantidad de colágeno se expresaría como la cantidad de gelatina congelada en relación con el peso del hueso seco. Lo que se analizaría sería un mg de esta gelatina, que se sometería a un proceso de combustión (oxidación y luego reducción) y se pasaría por un espectrómetro de masas para determinar la cantidad de CO₂ y de N₂ producida.

Para que las muestras sean útiles, los niveles de colágeno deben estar entre el 1 y el 20%; si son superiores se pueden someter a un nuevo lavado con HCl; además la relación entre el C y el N debe estar entre 2.9 y 3.6

Teniendo en cuenta el propósito de los análisis de isótopos estables mencionado anteriormente, se deben tomar muestras de diversa índole. Con ello se hace referencia tanto a elementos provenientes del contexto arqueológico, como muestras de referencia actuales que contribuyan a hacer una reconstrucción del medio natural en el que se hallaban inmersas las distintas poblaciones y los posibles recursos alimenticios consumidos. Cada tipo de muestra debe ser sometida a unos tratamientos específicos para evitar su deterioro en el proceso de envío al laboratorio. A continuación se detallan algunos de ellos.

En primer lugar las muestras se deben lavar con agua destilada antes de proceder a secarlas con el fin de eliminar posibles sedimentos y contaminantes externos.

En el caso de restos vegetales, se recomienda enviar entre 1 y 2 gramos, para tener muestra de sobra, ya que para los análisis sólo se necesitan 5 mg. Éstos han de ser deshidratados en horno a 40-60°C durante unas 5-10 horas. Otra opción es prensarlas con periódicos y algún elemento pesado. Este proceso de deshidratación previene la descomposición.

Cuando se trata de otros materiales orgánicos, como piel, pelo, plumas, etc, se pueden preservar en alcohol etílico al 70%, o pueden ser deshidratados al igual que los restos vegetales. La cantidad mínima requerida es de 1-2 mg pero se recomienda enviar una cantidad mayor.

Para el análisis de huesos humanos o animales, hacen falta unos 200 mg si se trata de restos antiguos y de 100 mg si son recientes. Una vez más, se recomienda enviar entre 1 y 5 gr, para no quedarse cortos.

Si se van a enviar sedimentos no hace falta someterlos a ningún tipo de tratamiento previo y se deben enviar en un bote plástico, similar al de los antiguos carretes.

En el caso de las conchas marinas o terrestres hay que tener en cuenta varios factores. El ideal es estudiar entre 5 y 10 conchas de cada yacimiento para obtener una estimación media de múltiples individuos. Si no tienen animal vivo se deben enviar sin ningún tratamiento, se necesita menos de 1 mg para el análisis de carbonatos, pero conviene enviar la concha entera. En el caso de que tengan al animal vivo se pueden enviar las dos partes juntas en alcohol del 70%. También se puede separar al animal de la concha sin perder la relación de a que animal corresponde a cada concha; a continuación éste se deshidrata como el resto de los animales.

Por último si se van a enviar muestras de agua, de lluvia, subterránea o de mar, éstas deben ir en botes cerrados herméticamente lo más rápido posible para evitar la evaporación y el fraccionamiento isotópico. Se necesitan entre

5 y 10 ml de agua para el análisis de O e H.

Estudios Genéticos

Hacia finales de los años ochenta y principios de los noventa, se empezaron a publicar los primeros estudios que hablaban de la recuperación de ADN proveniente de restos antiguos. Después de un periodo inicial de gran proliferación de publicaciones al respecto, se empezaron a cuestionar muchos de los resultados que se habían obtenido.

Las dudas que se empezaron a plantear se basaban en dos características fundamentales del ADN antiguo. La primera es la degradación que sufre el ADN constantemente, incluso estando el individuo vivo, que deja de repararse cuando éste muere. Con el transcurso del tiempo las moléculas se encontrarán cada vez más dañadas, al ser afectadas por procesos como la oxidación o las lesiones hidrolíticas (Paabo et al., 2004).

La segunda característica del ADN antiguo está estrechamente ligada con la primera. Al trabajar con un ADN degradado, las técnicas utilizadas para amplificarlo, es decir multiplicarlo para que se pueda ver, deben ser muy sensibles para que puedan funcionar incluso con fracciones mínimas de éste. Esta sensibilidad es contraproducente en tanto en cuanto también es extremadamente sensible a cualquier tipo de contaminación con ADN moderno. Además, el ADN moderno, al estar en mejores condiciones, será preferentemente amplificado en el caso de hallarse los dos tipos de ADN en la reacción de amplificación.

Teniendo en cuenta esta problemática se hace indispensable tomar la mayor cantidad de medidas posibles para contrarrestar la contaminación y para intentar garantizar que los restos analizados contengan ADN suficiente para ser estudiado.

En primer lugar hay que decidir de donde se toma la muestra. Estudios como los presentados por Gilbert (2005), entre otros, plantea que el diente es la región anatómica más adecuada. Esta postura se fundamenta en algunas de las características de los dientes, así como del resto de los huesos. En primer lugar el esmalte, al ser el tejido más resistente del cuerpo humano, actúa como protector del ADN que se encuentra en su interior. Sin embargo, como ya menciona Gilbert (2005), esto no quiere decir que el diente esté completamente aislado, ya que a través de los canales que hay en la raíz del mismo es posible que se produzca una contaminación. A pesar de ello, en comparación con el hueso el diente sigue siendo la región anatómica idónea para obtener muestras para los estudios de ADN. Gilbert (2005) también plantea que hay una relación bastante directa entre el grado de degradación del hueso, con un aumento de su porosidad, y las posibilidades de encontrar contaminación, tanto en los huesos como en los dientes. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar a los individuos que serán sometidos a este tipo de análisis.

A la hora de tomar las muestras se debe tener en cuenta lo mencionado anteriormente. Por ello, las piezas de mayor interés serán los caninos, incisivos, premolares y por último los molares, ya que éstos tienen varias raíces y son más susceptibles a la fisuras y al desgaste. Se debe intentar que el diente elegido no tenga ninguna fisura o fractura; además debe evitarse escoger dientes muy desgastados en donde haya una exposición de la dentina. Dependiendo de los protocolos de extracción que se utilicen, es posible que no sea necesaria la destrucción del diente y que éste pueda ser reconstruido. Sin embargo, es necesario realizar las medidas y los análisis antropológicos previamente al envío de las muestras. En caso de no disponer de dientes se puede intentar una extracción de ADN a partir del hueso. En este caso se prefieren los huesos largos, porque tienen una corti-

cal más gruesa, sobre todo el fémur. Tendrían menor interés los huesos cortos y los planos, que no suelen dar muy buenos resultados. La cantidad necesaria depende de la degradación de la pieza, pero suele ser suficiente con entre 5 y 10 gramos.

Los dos problemas, la degradación y la contaminación, del ADN antiguo han sido ampliamente discutidos por los investigadores a la hora de validar los resultados obtenidos. Merece la pena mencionar algunas conclusiones que se han obtenido, aunque algunas veces pueden ser contradictorias, ya que en ocasiones éstas atañen directamente a los arqueólogos y a los antropólogos en contacto con la muestra. Una de las primeras cuestiones sería lo mencionado por Smith (2003) quien enfatiza que, en numerosas ocasiones, es más importante el medio ambiente, temperatura, humedad, etc., en el que se encuentran las piezas que la antigüedad de las mismas a la hora de determinar si unos restos son susceptibles de ser analizados genéticamente. Por ello, propone analizar las condiciones, pasadas y presentes, del lugar de donde provienen las muestras para tener una idea de los resultados que se pueden esperar de ellas.

Siguiendo con cuestiones sobre la degradación Pruvost (2004) propone la aplicación de la PCR, o amplificación, en tiempo real, un proceso por medio del cual se puede saber la cantidad de ADN que tiene la muestra en un principio; esto permitiría garantizar unos mínimos que validen los resultados. También se plantea que el ideal es estudiar muestras recién excavadas, pero esto no siempre es posible.

Con respecto a las fuentes principales de contaminación existen varias posturas. Autores como Fregel et al. (2009) plantean que la manipulación de los antropólogos y en el laboratorio de genética son una mayor fuente de contaminación; mientras que autores como

Sampietro (2006), defienden lo contrario, argumentando que la mayor parte de la contaminación se produce durante el proceso de excavación.

Por todo esto se deben tomar una serie de medidas a la hora de manipular restos que puedan ser susceptibles de análisis genéticos, como sería el caso de los dientes. Durante la excavación sería recomendable el uso de guantes por parte de aquellas personas en contacto directo con los restos. Como esto no siempre es posible por las condiciones de una excavación arqueológica, se debe intentar reducir la manipulación al mínimo e intentar tener controladas a las personas que tengan contacto directo con estas regiones anatómicas de los individuos (para en caso necesario establecer su perfil genético y descartar una posible fuente de contaminación moderna de las muestras). Ya en el laboratorio se sigue recomendando la utilización de guantes para la manipulación. En ambos casos también sería idóneo tener los perfiles genéticos de aquellas personas que han manipulado los materiales, para descartar posibles contaminaciones. Todas estas medidas estarán, en todo caso condicionadas por la situación particular de cada yacimiento, por ejemplo si la excavación es muy antigua o no.

Una vez las muestras se han enviado al laboratorio se siguen una serie de criterios, ya establecidos, que permiten la autenticación de los resultados (Paabo et al., 2004). Estos pretenden constatar los posibles artefactos⁵ que se pueden dar como consecuencia de la contaminación y de la degradación. Estos criterios se pueden resumir en siete puntos. El primero es la clonación de los productos de la amplificación y su posterior secuenciación. El segundo es la utilización de controles negativos tanto en la extracción como en la amplificación. El tercero es hacer repetidas amplificaciones de un mismo, o de varios, extractos. El cuarto es la cuantificación del número de moléculas de

ADN amplificables. El quinto sería confirmar una correlación negativa entre la eficiencia de la amplificación y la longitud del fragmento a amplificar. El sexto sería la utilización de pruebas bioquímicas que ayuden a evaluar la preservación macromolecular de la muestra. El séptimo sería la exclusión de inserciones nucleares de ADN mitocondrial. Por último sería necesario la reproducción de los estudios en un segundo laboratorio.

Como conclusión de este apartado es importante resaltar que, a pesar de las importantes problemáticas que plantea el estudio de ADN antiguo, los resultados pueden ser de gran utilidad para la comprensión de las sociedades del pasado. Pääbo et al. (2004) nos presentan algunas de las múltiples aplicaciones que tiene el estudio de ADN antiguo en restos humanos, además de la gran cantidad de información que se puede obtener del ADN de especies animales y vegetales. Es por esto que los arqueólogos deben esforzarse en intentar minimizar las posibles contaminaciones en las etapas del proceso que les corresponden. Una adecuada y cuidadosa toma de las muestras puede ser la diferencia entre unos resultados positivos o la imposibilidad de obtener alguno.

Banco de muestras

Una vez tomadas las muestras y, con anterioridad a su envío a los distintos laboratorios, éstas deben ser almacenadas convenientemente en un lugar destinado para ello; configurándose así lo que se denomina un Banco de Muestras. La necesidad de crear este almacén específico se debe a que en muchas ocasiones no se cuenta con la financiación necesaria para realizar todos los análisis descritos, por lo que es conveniente guardarlas con las mayores garantías hasta el momento de su utilización. En este caso deben figurar de forma clara e inequívoca los datos de procedencia y el contexto arqueológico.

Uno de los grandes objetivos de estos bancos sería la creación de grandes colecciones de referencias con las que poder realizar análisis comparativos entre sociedades distantes en el tiempo y el espacio. Las muestras deben estar disponibles a cualquier investigador, favoreciéndose así el intercambio entre los distintos bancos nacionales e internacionales.

En este sentido, el Dto. De Prehistoria, Antropología e Historia Antigua de la Universidad de La Laguna se ha sumado a estas iniciativas, pues actualmente cuenta con un banco que alberga cientos de muestras procedentes de culturas tan distantes como los antiguos incas de Perú o musulmanes y visigodos medievales, pasando por todas las culturas aborígenes canarias, así como poblaciones de los siglos XVI, XVII y XVIII.

A continuación presentamos, a modo de ejemplo, la tabla con la relación de las muestras antropológicas seleccionadas en el material del Tolmo de Minateda, proveniente de Albacete. Este trabajo se realizó en el laboratorio del Departamento de Prehistoria, Antropología e Historia Antigua de la Universidad de La Laguna. Se estudiaron un total de 16 sepulturas que contenían un número mínimo de individuos de 23 sujetos. Los cuerpos llegaron al Laboratorio embalados en dos grandes cajas y guardados en bolsas individuales. Por ello, primeramente se seleccionaron aquellas bolsas que contenían sedimento que habían estado en contacto directo con regiones como el cráneo o los coxales, para su estudio y análisis posterior. Seguidamente se procedió a una exhaustiva limpieza de todas las regiones anatómicas, recogiendo y guardándose parte de la tierra adherida al hueso para realizar los pertinentes análisis químicos y de fitolitos. Finalmente, y después del siglado, el inventario, la toma de fotografías, y de abordar los distintos estudios macroscópico de los huesos, se procedió a la toma de muestras de la siguiente forma:

INDIVIDUOS	MUESTRA DIENTE		MUESTRA HUESO
	Química	Genética	
16038	Sin muestra	Sin muestra	1. Esponjoso tibia 2. Cortical tibia 3. Cortical fémur 4. Esponjoso calcáneo 5. Cortical pala iliaca 6. Esponjoso pala iliaca
1130	Sin muestra	-Diente 25	1. Esponjoso tibia 2. Cortical tibia 3. Cortical fémur distal derecho 4. Esponjoso fémur distal derecho 5. Cortical pala iliaca izquierda 6. Esponjoso pala iliaca izquierda
16032	Sin muestra	Sin muestra	1. Esponjoso tibia izquierda, parte proximal 2. Cortical tibia izquierda parte proximal 3. Costilla derecha 4. Esponjoso pala iliaca derecha 5. Cortical pala iliaca derecha 6. Raíces de la parte proximal de la tibia
13021	Sin muestra	Sin muestra	1. Esponjoso tibia izquierda parte proximal 2. Cortical tibia izquierda parte proximal 3. Costilla indeterminada parte distal 4. Se adjunta también muestra de hongos que afectaban a la tibia
12014	Sin muestra	-Diente 33	1. Esponjoso tibia derecha parte proximal 2. Cortical tibia derecha parte proximal 3. Esponjoso fémur derecho parte distal 4. Cortical fémur derecho parte distal 5. Cortical pala iliaca derecha 6. Esponjoso pala iliaca derecha 7. Esponjoso calcáneo izquierdo 8. Cortical calcáneo izquierdo 9. Costilla indeterminada
14023	Sin muestra	Sin muestra	1. Esponjoso tibia derecha parte proximal 2. Cortical tibia derecha parte proximal 3. Esponjoso fémur derecho parte proximal 4. Cortical fémur derecho parte proximal 5. Cortical pala iliaca izquierda 6. Esponjoso pala iliaca izquierda 7. Cortical calcáneo izquierdo 8. Esponjoso calcáneo izquierdo con raíces
15011	Sin muestra	Sin muestra	1. Esponjoso tibia izquierda parte proximal 2. Cortical tibia izquierda parte proximal 3. Esponjoso fémur izquierdo parte proximal 4. Cortical fémur izquierdo parte proximal 5. Esponjoso pala iliaca izquierda 6. Cortical pala iliaca derecha 7. Esponjoso calcáneo derecho con raíces 8. Cortical calcáneo derecho
13025	Sin muestra	Sin muestra	1. Esponjoso tibia derecha parte proximal (con raíces) 2. Cortical tibia derecha parte proximal 3. Esponjoso y cortical epífisis fémur derecho 4. Cortical fémur derecho parte distal 5. Esponjoso pala iliaca derecha 6. Cortical pala iliaca derecha, con un poco de hueso esponjoso

BIBLIOGRAFÍA

AMBROSE, S. H. & DENIRO, M. J. (1989).

Climate and habitat reconstruction using stable carbon and nitrogen isotope ratios of collagen in prehistoric herbivore teeth from Kenya. *Quaternary Research*, 31, 407-422.

ARNAY DE LA ROSA, M., GONZÁLEZ-REIMERS, E. Y GALINDO MARTÍN, L. (2008). La Necrópolis de Medellín. Análisis químicos de los restos óseos humanos de la Necrópolis de Medellín. In: (ED.), A. M. (ed.) *La Necrópolis de Medellín*. Madrid.

ARNAY DE LA ROSA, M. G. R., E.; GÁMEZ MENDOZA, A. Y GALINDO MARTÍN, L. (2009). The Ba/Sr ratio, carious lesions, and dental calculus among the population buried in the church La Concepción (Tenerife, Canary Islands). *Journal of Archaeological Science*, 36, 351-358.

ARNAY, M., ET AL. (2003). Bone cadmium and lead in 18th century population groups from the Canary Islands. *Journal of Trace and Microprobe techniques*, 189-196.

ARNAY, M. E. A. (1998). Bone trace elements pattern in an XVIIIth Century population sample of Tenerife: Comparison with a prehistoric one. *Biological Trace Elements Research*, 65, 45-51.

BALTER, V. (2004). Allometric constraints on Sr/Ca and Ba/Ca partitioning in terrestrial mammalian trophic chains. *Oecologia* 139, 83-88.

BROWN, A. B. 1974. Bone strontium as dietary indicator in human skeletal populations. *Contributions to Geology*, 13, 47-48.

BUIKSTRA, J. E. Y. U. D. (1994). *Standards. For data collection from human skeletal remains*, Arkansas, Arkansas Archaeological Sur-

vey Research Series.

CAMPILLO, D. 2001. *Introducción a la paleopatología* Barcelona Bellaterra Arqueología.

ERICSON, J. 1985. Strontium isotope characterization in the study of prehistoric human ecology. *J. Hum. Evol*, 14, 503-514.

EZZO, J. A. (1994). Zinc as a paleodietary indicator: an issue of theoretical validity in bone chemistry analysis. *Am. Antiq.*, 59, 606-621.

EZZO, J. A. J., C. M.; PRICE, T. D. (1997). Analytical perspectives on prehistoric migration: a case study from East-Central Arizona. *Journal of Archaeological Science*, 24, 447-466.

FEREMBACH, D., SCHWIDETZKY, I. & STLOUKAL, M. (1979). RECOMMENDATIONS FOR AGE AND SEX DIAGNOSES OF SKELETONS. *Bulletins Et Memoires De La Societe D Anthropologie De Paris*, 6, 7-45.

FREGEL, R., PESTANO, J., ARNAY, M., CABRERA, V. M., LARRUGA, J. M. & GONZALEZ, A. M. (2009). The maternal aborigine colonization of La Palma (Canary Islands). *European Journal of Human Genetics*, 17, 1314-1324.

GILBERT, M. T. P., RUDBECK, L., WILLLERSLEV, E., HANSEN, A. J., SMITH, C., PENKMAN, K. E. H., PRANGENBERG, K., NIELSEN-MARSH, C. M., JANS, M. E., ARTHUR, P., LYNNERUP, N., TURNER-WALKER, G., BIDDLE, M., KJOLBYE-BIDDLE, B. & COLLINS, M. J. (2005). Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, 32, 785-793.

GONZÁLEZ-REIMERS, E. (2008). *Paleodieta y paleonutrición*. In: (ED), A. C. J. (ed.) *Naturaleza amenazada por los cambios en el clima*, Actas III Semana Científica Telesforo Bravo, Pto. De la Cruz (Tenerife). . Pto. De la Cruz (Tenerife). .

GRUPE, G. P., T. D.; SCHRÖTER, P., SÖLINER, F (1997). Mobility of Bell Baker people revealed by Sr isotope ratios of tooth and bone: a study of southern Bavarian skeletal remains. *Applied Geochemistry*, 12, 517-525.

PAABO, S., POINAR, H., SERRE, D., JAE-NICKE-DESPRES, V., HEBLER, J., ROHLAND, N., KUCH, M., KRAUSE, J., VIGILANT, L. & HOFREITER, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38, 645-679.

PRICE, T. D. K., M. (1982). Bone composition and the reconstruction of diet: examples from the Midwestern United States. *J. Archeol. Sci.* , 7, 63-79.

PRUVOST, M. & GEIGL, E. M. (2004). Real-time quantitative PCR to assess the authenticity of ancient DNA amplification. *Journal of Archaeological Science*, 31, 1191-1197.

RICHARDS, M. H., K.; GRIMES, V.; SMITH, C.; SMITH, T.; HUBLIN, JJ; KARKANAS, P.; PANAGOPOULOU, E. (2008). Strontium isotope evidence of Neanderthal mobility at the site of Lakonis, Greece using laser-ablation PIMMS. *Journal of Archaeological Sciences*, 35, 1251-1256.

SAMPIETRO, M. L., GILBERT, M. T. P., LAO, O., CARAMELLI, D., LARI, M., BERTRANPETIT, J. & LALUEZA-FOX, C. (2006). Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 1801-1807.

SMITH, C. I., CHAMBERLAIN, A. T., RILEY, M. S., STRINGER, C. & COLLINS, M. J. (2003). The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *Journal of Human Evolution*, 45, 203-217.

TRANCHO, G. E. A. (1996). Reconstrucción del patrón alimenticio de dos poblaciones prehistóricas. *Complutum*, 7, 74-90.

VELASCO VÁZQUEZ, J. (1999). *Canarios. Economía y dieta de una sociedad prehistórica*, Las Palmas de Gran Canaria.

NOTES

¹ Hoy existe una importante investigación sobre las antiguas migraciones humanas que se apoyan en estos análisis químicos. Por ejemplo: (Ezzo et al., 1997; Grupe et al., 1997; Price et al., 1998; Richards et al. 2008.)

² Junto con el manganeso y el zinc, también podemos incluir el cobre. Los alimentos que proporcionan un mayor aporte de cobre al organismo son los productos cárnicos, entre los que se incluyen los moluscos y los peces, aunque también es posible encontrar este elemento en las nueces o algunas variedades de legumbres. En cambio los cereales muestran pocas cantidades de este elemento. En este sentido podemos atribuir a la presencia de elevadas proporciones de cobre en el hueso el consumo de una dieta rica en proteínas (Velasco Vázquez, 1999: 337).

³ El estroncio además se acumula en hueso y es inerte desde el punto de vista metabólico, por lo que la determinación de niveles de estroncio en el hueso, es un método muy útil para establecer la dieta en poblaciones antiguas. (M. Arnav de la Rosa, E. González Reimers y L. Galindo Martín, 2008 : 834)

⁴ El consumo de dieta vegetal tendría un índice normal, con Sr y Ba altos, en cambio, una dieta de origen marino tendría un índice Ba/Sr bajo. De forma logarítmica, el Ba/Sr tendría valores 0 y -0.4 para una dieta de origen terrestre, pero para una dieta de origen marino el log estaría entre -1,4 y -1,8 (González-Reimers, 2008: 34).

⁵ En los estudios genéticos, se consideran artefactos a productos artificiales de reacciones como la PCR1.